



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A ANIMAIS
DE INTERESSE REGIONAL – PPGTAIR

ELYSE MEDEIROS OLIMPIO BOMFIM

***Leishmania (Leishmania) infantum* EM ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTIVO DE
CÃES DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE TIMON, MARANHÃO**

Teresina – PI

2024

ELYSE MEDEIROS OLIMPIO BOMFIM

***Leishmania (Leishmania) infantum* EM ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTIVO DE
CÃES DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE TIMON, MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Diagnósticos Avançados em Saúde Animal
Linha de Pesquisa: Diagnóstico e Terapêutica em Medicina Veterinária
Orientador: Profa. Dra. Luanna Soares de Melo Evangelista
Coorientador: Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz

Teresina – PI

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Setorial Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Representação Temática da Informação

B6951 Bomfim, Elyse Medeiros Olimpio.

Leishmania (Leishmania) infantum em órgãos do sistema reprodutivo de cães domiciliados no município de Timon, Maranhão.

/ Elyse Medeiros Olimpio Bomfim. -- 2024.

39 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2025.

“Orientadora: Profa. Dra. “Luana Soares de Melo Evangelista.”

**Leishmania (Leishmania) infantum EM ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTIVO DE
CÃES DOMICILIADOS NO MUNICÍPIO DE TIMON, MARANHÃO**

ELYSE MEDEIROS OLIMPIO BOMFIM

Banca Examinadora:

Luanna Soares de Melo Evangelista

Profª. Dra. Luanna Soares de Melo Evangelista
(Presidente / Orientadora) DPM/CCS/UFPI

Maria do Socorro Pires e Cruz

Profª. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz
(Presidente / Examinadora interna) DMV/CCA/UFPI

Ivete Lopes de Mendonça

Profª. Dra. Ivete Lopes de Mendonça
(Examinadora interna) DCCV/CCA/UFPI

Luana Dias de Moura

Profª. Dra. Luana Dias de Moura
(Examinadora externa) UNIFSA

AGRADECIMENTOS

Gratidão à Aquele que é o sentido da minha vida. Sem Deus eu nada faria.

Agradeço a minha família, meu esposo Diego e meu filho Henry Lucas que sempre me apoiaram e foram compreensíveis em minhas ausências. Assim como meus avós maternos e minha mãe Geysa.

Obrigada a minha orientadora professora Dra. Luanna Evangelista pela sua maternidade, acolhimento, profissionalismo e paciência na docência. Qualidades inspiradoras que faltam em muitos profissionais e que me fizeram chegar até este dia.

Agradeço também aos colegas de pós-graduação, os quais foram fundamentais nesse tempo de pesquisa.

***Leishmania (Leishmania) infantum* em órgãos do sistema reprodutivo de cães
domiciliados no município de Timon, Maranhão**

RESUMO

Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença parasitária causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (L.) infantum* sendo transmitida, principalmente, por vetores flebotômicos. Nos centros urbanos das Américas o cão é considerado o principal reservatório doméstico da doença e de acordo com a literatura, as formas de transmissão sexual e vertical têm sido consideradas cada vez mais prováveis nessa espécie animal. O objetivo desse trabalho foi avaliar a prevalência de LV e a presença de *Leishmania infantum* nos órgãos genitais de cães domiciliados no município de Timon, Maranhão. Esse trabalho foi autorizado pelo CEUA/UFPI sob o número de protocolo 755/2022 e realizado no período de dezembro de 2022 a agosto de 2023. Foram coletados sangue, aspirado de medula e de linfonodos poplíteos de 34 cães, sendo 15 fêmeas e 19 machos adultos que foram atendidos na Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) de Timon. Vinte e quatro eram sem raça definida (SRD). Em todos os animais foi realizado o teste sorológico de ELISA® (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, Kit EIE LV Canina Bio-Manguinhos), além do parasitológico de medula por meio de esfregaço e cultura em meio NNN enriquecido com meio Schneider's para a pesquisa do protozoário. Posteriormente, foram colhidos material da vagina e prepúcio, e realizadas orquiectomia nos cães e ovariectomia nas cadelas, para a retirada do complexo testículo-epidídimo (CTE) e útero, respectivamente. Adicionalmente, foi realizada a reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional e quantitativa (qPCR) da medula e dos órgãos genitais supracitados. Dos 34 animais avaliados, 16 (47,0%) foram positivos para LV no ELISA, demonstrando uma alta soroprevalência da doença em cães de Timon, durante o período do estudo. Dos testes parasitológicos e moleculares realizados, 15 (44,1%) cães apresentaram o protozoário no esfregaço de medula; destes 11 (32,3%) na cultura e 10 (29,4%) no qPCR de medula, confirmando a presença de *Leishmania* nestes animais. Conforme o teste de McNemar's empregado, cães positivos para LV no exame parasitológico de esfregaço de medula tem uma razão de chance (OR) de 87,5% de também serem positivos no PCR. Com relação ao encontro do parasito nos órgãos do sistema reprodutivo, 02 cadelas (5,9%) apresentaram positividade no swab vaginal e 02 cães no prepucial. Quatorze animais (41,2%) confirmaram a presença do protozoário por meio do qPCR nos CTE e útero, sendo 09 machos e 05 fêmeas, corroborando com a literatura que revela um maior tropismo de *Leishmania infantum* para os órgãos genitais de machos caninos infectados. Portanto, é importante associar testes parasitológicos e moleculares para o diagnóstico da doença em cães domiciliados em áreas endêmicas, destacando, ainda, que a técnica de qPCR é uma excelente ferramenta para detectar a presença do DNA do parasito em órgãos genitais de cães e cadelas com LV, ajudando a elucidar o ciclo epidemiológico da doença, servindo de alerta e vigilância para a possibilidade de transmissão sexual e vertical nessa espécie animal.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; Órgãos genitais; Caninos.

***Leishmania (Leishmania) infantum* in the reproductive organs of dogs living in the city of Timon, Maranhão**

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a parasitic disease caused by the protozoan species *Leishmania (L.) infantum*, primarily transmitted by sandfly vectors. In urban centers in the Americas, dogs are considered the main domestic reservoir of the disease, and according to the literature, sexual and vertical transmission routes have increasingly been considered likely in this animal species. The aim of this study was to evaluate the prevalence of VL and the presence of *Leishmania infantum* in the genital organs of dogs living in the city of Timon, Maranhão. This study was authorized by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA/UFPI) under protocol number 755/2022 and was conducted from December 2022 to August 2023. Blood, bone marrow aspirates, and popliteal lymph node samples were collected from 34 dogs, including 15 females and 19 adult males, all of which had been treated at the Zoonosis Surveillance Unit (UVZ) in Timon. Twenty-four of the dogs were mixed-breed. All animals underwent the ELISA® (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Bio-Manguinhos Canine EIE LV Kit) serological test, as well as bone marrow parasitological tests using smears and culture in NNN medium enriched with Schneider's medium to identify the protozoan. Subsequently, vaginal and preputial samples were collected, and orchiectomies were performed on the male dogs and ovariohysterectomies on the female dogs to remove the testicular-epididymal complex (TEC) and uterus, respectively. Additionally, conventional (PCR) and quantitative (qPCR) reactions were carried out on the bone marrow and the above-mentioned genital organs. Of the 34 animals evaluated, 16 (47.0%) were positive for VL in the ELISA test, indicating a high seroprevalence of the disease in dogs from Timon during the study period. Of the parasitological and molecular tests performed, 15 (44.1%) dogs showed the protozoan in the bone marrow smear; of these, 11 (32.3%) were positive in culture, and 10 (29.4%) were positive in qPCR of bone marrow, confirming the presence of *Leishmania* in these animals. According to the McNemar test, dogs that were positive for VL in the bone marrow smear had an odds ratio (OR) of 87.5% of also being positive in the PCR test. Regarding the detection of the parasite in the reproductive organs, 2 female dogs (5.9%) were positive in the vaginal swab, and 2 male dogs were positive in the preputial swab. Fourteen animals (41.2%) confirmed the presence of the protozoan through qPCR in the TEC and uterus, with 9 males and 5 females, supporting the literature that suggests a higher tropism of *Leishmania infantum* for the genital organs of infected male dogs. Therefore, it is important to combine parasitological and molecular tests for diagnosing the disease in dogs living in endemic areas. Additionally, the qPCR technique proves to be an excellent tool for detecting the presence of the parasite's DNA in the genital organs of dogs and bitches with VL, helping to clarify the epidemiological cycle of the disease and raising awareness of the potential for sexual and vertical transmission in this animal species.

Keywords: Visceral leishmaniasis; Genitals; Canines.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Adultos de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (mosquito-palha)..... | 12 |
| Figura 2. Representação esquemática de avaliação do índice composto de leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020 | 13 |
| Figura 3. Formas promastigotas do protozoário <i>Leishmania (L.) infantum</i> provenientes de meio de cultivo, coradas com Giemsa, objetiva de 100x | 14 |
| Figura 4. Formas amastigotas do protozoário <i>Leishmania (L.) infantum</i> infectando células do sistema fagocítico monocuclear de um cão, coradas com Panótico Rápido®, objetiva de 100x..... | 15 |
| Figura 5. Esquema representativo da transmissão de LV por via vertical (placentária)..... | 16 |
| Figura 6. Cães diagnosticados com LV apresentando sintomatologia clínica de blefarite, onicogribose e ulcerações cutâneas típicas..... | 17 |
| Figura 7. Sinais clínicos e/ou alterações clínico-patológicas compatíveis com leishmaniose visceral canina..... | 18 |
| Figura 8. Histopatologia de testículo de um cão diagnosticado com LV, mostrando degeneração e atrofia do epitélio seminífero..... | 20 |
| Figura 9. Imunohistoquímica de epidídimo de um cão diagnosticado com LV, mostrando infiltrado linfoplasmocitário e células infectadas por amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> (coradas em marrom, seta)..... | 21 |
| Figura 10. Gráfico dos principais sinais clínicos observados nos animais positivos para leishmaniose visceral..... | 25 |
| Figura 11. Prancha com as principais manifestações clínicas observadas nos animais. A e B: onicogribose; C: ectoparasitos; D, E e F: lesões dermatológicas; G: ferida em ponta de orelha; H: lesão dermatologica ulcerada na pata; I: blefarite/uveíte. | 26 |
| Figura 12. Total de cães positivos e negativos para LV no parasitológico e qPCR de aspirado de medula dos 34 animais avaliados, de acordo com o teste de McNemar's empregado..... | 27 |
| Figura 13. Total de cães positivos e negativos para LV no parasitológico de aspirado de medula e qPCR dos CTEs dos 19 machos avaliados, de acordo com o teste de McNemar's empregado..... | 28 |
| Figura 14. Total de cadelas positivas e negativas para LV no parasitológico de aspirado de medula e qPCR dos úteros das 15 fêmeas avaliadas, de acordo com o teste de McNemar's empregado..... | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------------|--|
| CEUA | Comitê de Ética no uso de animais |
| CCA | Centro de Ciências Agrárias |
| CCS | Centro de Ciências da Saúde |
| DCCV | Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária |
| DMV | Departamento de Morfofisiologia Veterinária |
| DNA | Ácido Desoxirribunucleico |
| DPM | Departamento de Parasitologia e Microbiologia |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| IM | Intramuscular |
| IV | Intravenoso |
| IMQ | Imunohistoquímica |
| LV | Leishmaniose Visceral |
| NNN | Novy-MacNeal-Nicolle |
| NUPCELT | Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células Tronco |
| PCR | Reação em Cadeia pela Polimerase |
| PPGTAIR | Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional |
| RIFI | Reação de Imunofluorescência Indireta |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SINAN | Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| UFPI | Universidade Federal do Piauí |
| UNIFSA | Centro universitário Santo Agostinho |
| UVZ | Unidade de Vigilância em Zoonoses |

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 11 |
| 3. METODOLOGIA..... | 232 |
| 3.1 Exame clínico dos animais..... | 22 |
| 3.2 Coleta de amostras..... | 24 |
| 3.3 Processamento de amostras..... | 253 |
| 3.4 Realização das castrações | 24 |
| 3.5 Análise estatística..... | 24 |
| 4. RESULTADOS..... | 26 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 30 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 31 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 32 |
| REFERÊNCIAS..... | 33 |

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária, conhecida popularmente como calazar. Essa enfermidade é uma zoonose, crônica, grave e de alta letalidade para o homem. Apresenta uma maior prevalência em regiões tropicais, sendo endêmica em mais de 70 países, com mais de 95% dos casos notificados no Brasil (Brasil, 2020; OPAS, 2021).

Estudos demonstram a correlação entre a distribuição espacial de cães soropositivos e a ocorrência de casos humanos, o que reforça a importância do cão como reservatório para infecções humanas (Margonari et al., 2006; Machado et al., 2007), contribuindo com grande relevância no exercício da clínica médica veterinária e humana, e consequentemente, no contexto da saúde pública.

Nas Américas, o agente etiológico da infecção é o protozoário da espécie *Leishmania (Leishmania) infantum*, responsável por parasitar humanos e animais. A LV é uma enfermidade vetorial, cujo vetor é um inseto flebotomíneo que exerce um papel muito importante no ciclo de vida do parasito (Bates, 2008). Esse hospedeiro é um invertebrado díptero hematófago pertencente à família Psychodidae, sendo que no Brasil duas espécies são descritas: *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi*, esta última é encontrada na região Centro-Oeste (Borges et al., 2017; Brasil, 2020).

Além da transmissão vetorial, existem relatos na literatura sobre a transmissão na ausência desse vetor, podendo ocorrer a transmissão da infecção em humanos por meio de agulhas compartilhadas (Cruz et al., 2002; Molina et al., 2013), transfusão de sangue (Dey; Singh, 2006; França et al., 2018), transmissão sexual e vertical (Low; Cooke, 1926; Symmers, 1960; Meinecke et al., 1999; Turchetti et al., 2014).

Em cães, a forma de transmissão sexual tem sido considerada provável (Silva et al., 2008; Benites et al., 2011), com relatos da presença do DNA do protozoário no sêmen e esmegma de animais infectados (Diniz et al., 2005; Silva et al., 2014). Além disso, processos inflamatórios pré-existentes podem recrutar macrófagos contendo *Leishmania*, podendo causar epididimite, orquite e degeneração testicular, consequentemente, reduzindo a qualidade espermática de machos caninos (Diniz et al., 2005; Melo Evangelista et al., 2020).

Em fêmeas, Silva et al. (2008) identificaram o DNA do protozoário no útero, ovário, tubas uterinas, vagina e vulva de cadelas, sendo estes últimos órgãos genitais os mais parasitados por *Leishmania* em cadelas (Boechat et al., 2016; Oliveira et al., 2016a). Portanto, a presença do parasito nos órgãos do sistema genital desses animais já foi comprovada, pontuando a importância da transmissão sexual e vertical também na espécie canina.

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência de LV e a presença de *Leishmania (L.) infantum* nos órgãos do sistema reprodutivo de cães e cadelas domiciliados no município de Timon-MA, Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

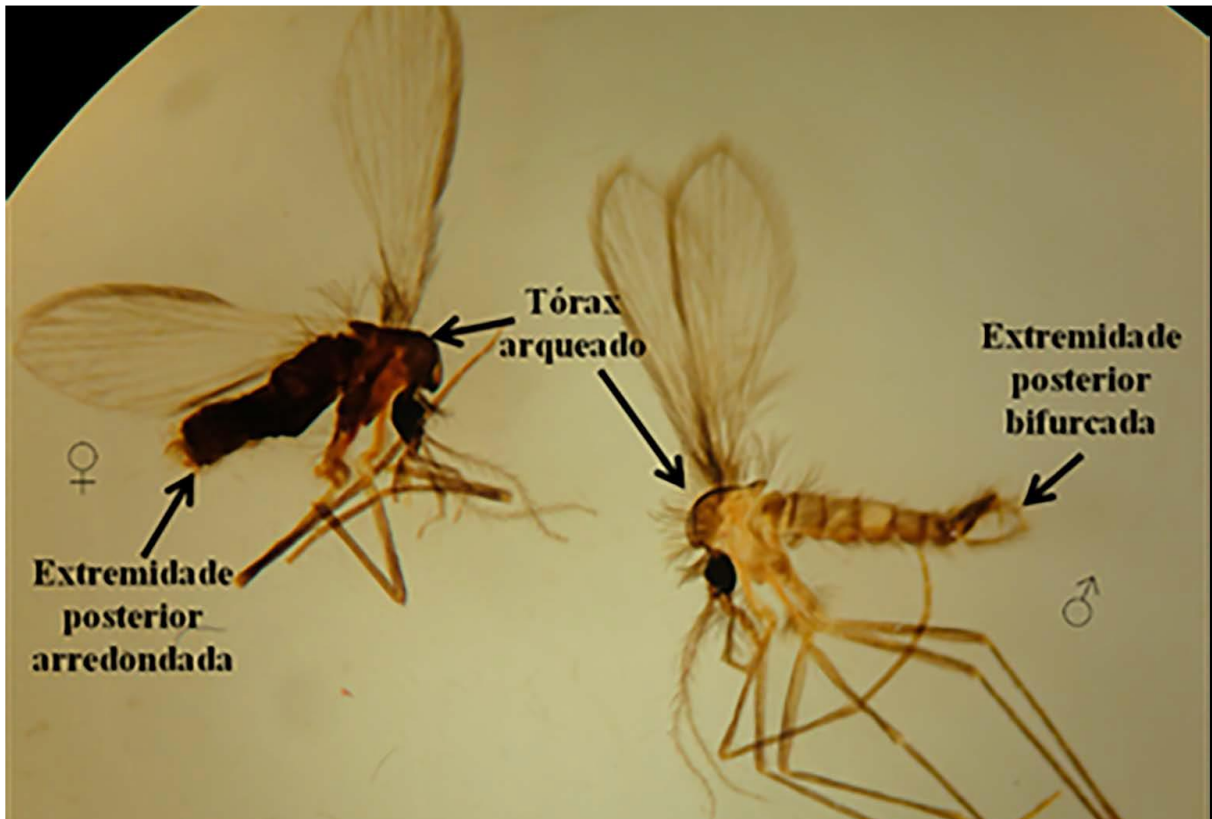
Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) representa uma enfermidade endêmica em cinco continentes, com incidência em humanos documentada em cerca de 75 países situados em regiões de clima tropical e subtropical. Estima-se que a incidência anual da patologia varie de 200.000 a 400.000 novos casos. Tais estatísticas são subestimadas devido à ausência de obrigatoriedade de notificação da condição em grande parte dos países afetados, somada à falta de vigilância e investigações sistemáticas, assim como a carência de um sistema adequado de armazenamento de dados (Marcondes; Rossi, 2013; OPAS, 2021).

No Brasil, *Leishmania (L.) chagasi*, também conhecida como *Leishmania (L.) infantum* é o agente etiológico associado à LV, sendo transmitida principalmente pela picada de fêmeas hematófagas da espécie *Lutzomyia longipalpis*, um inseto de significativa importância epidemiológica (Figura 1). Essa relação simbiote-patógeno desempenha um importante papel na dinâmica de transmissão e na distribuição geográfica da doença, constituindo uma área de pesquisa de grande relevância para o entendimento mais profundo dos mecanismos de patogenicidade e interações hospedeiro-vetor (Viotto, 2018).

A transmissão da LV ocorre principalmente durante o repasto sanguíneo de insetos vetores infectados em regiões endêmicas. Durante a picada, promastigotas do protozoário que ficam nas glândulas salivares do inseto são regurgitadas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, como cães e humanos, onde se multiplicam, se desenvolvem em amastigotas e causam a infecção sistêmica característica da doença (Kamhawi, 2006). Esse ciclo de transmissão biológica é essencial para a manutenção da doença em áreas endêmicas e está sujeito a fatores ambientais, climáticos e de ecologia do vetor.

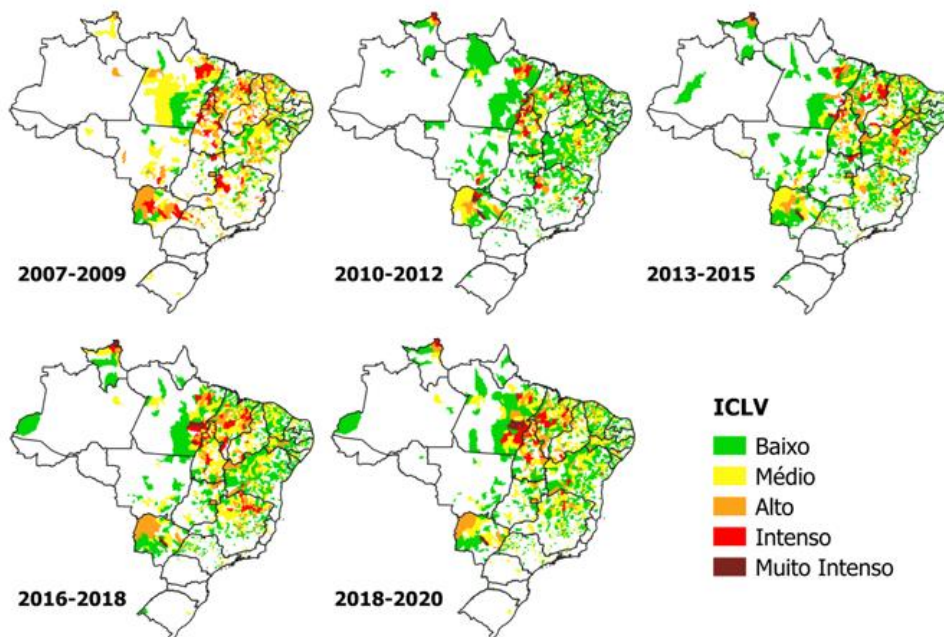
Figura 1. Adultos de *Lutzomyia longipalpis* (mosquito-palha).



Fonte: Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia da UFMG.
Atlas de Parasitologia Veterinária, 2019.

Conforme os dados analisados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), a distribuição de LV no Brasil, no período de 2007 a 2020, revelou uma dinâmica complexa e variável, sendo evidenciados mais de 48.000 casos da doença, com uma incidência média de 25,53 casos por 100.000 habitantes, com destaque para municípios nas regiões Norte e Nordeste, onde a incidência superou 50 casos por 100.000 habitantes. O índice composto de leishmaniose visceral (ICLV), calculado pelo SINAN, indicou um aumento na classificação de municípios como de baixo risco de transmissão, enquanto o número de cidades com maior risco (muito intenso) aumentou ao longo do período. Notavelmente, a região de fronteira entre Maranhão, Tocantins e Pará, juntamente com o estado do Ceará, emergiram como áreas de alta incidência e risco significativo, destacando-se na distribuição espacial da doença (Nina et al., 2023).

Figura 2. Representação esquemática de avaliação do índice composto de leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020.



Fonte: Nina et al., 2023.

A LV é uma doença de caráter zoonótico, que significa que ela pode ser transmitida entre animais vertebrados e seres humanos. Os cães são considerados os principais reservatórios de *Leishmania infantum* em áreas urbanas e periurbanas, desempenhando um papel crucial na transmissão da doença para o homem. O ciclo zoonótico da doença contribui para a complexidade da sua epidemiologia, exigindo estratégias de controle que visem não apenas os seres humanos infectados, mas também os animais domésticos que podem atuar como reservatórios da infecção (Souza et al., 2019).

Leishmaniose Visceral Canina

A LV é uma zoonose prevalente no Brasil. É causada pelo protozoário da espécie *Leishmania (L.) infantum*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O vetor é representado por insetos dípteros hematófagos da família Psychodidae, cujas espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi* ocorrem no Brasil (Borges et al., 2017; Nogueira et al., 2021).

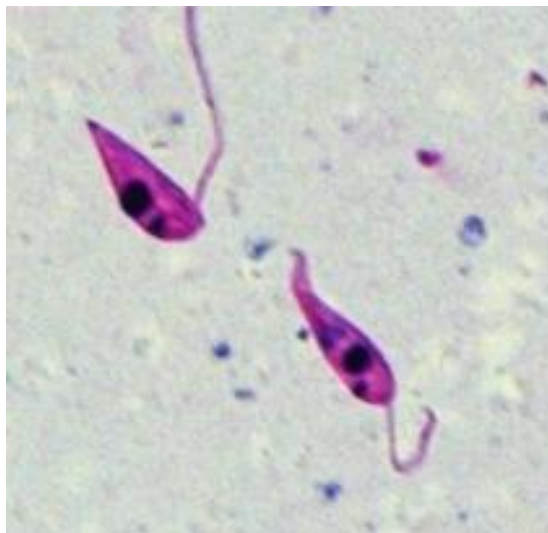
A incidência crescente da doença no país aponta sobre a importância dos cães no ciclo de transmissão, considerados os principais reservatórios domésticos do parasito. A presença de um elevado parasitismo cutâneo nos cães favorece a infecção do flebotomíneo, contribuindo para a disseminação da enfermidade (Nina et al., 2023).

No ciclo evolutivo do protozoário, o vetor se infecta quando faz repasto sanguíneo em um animal ou homem infectado, ingerindo as formas amastigotas presentes na derme destes hospedeiros e transmite regurgitando as formas promastigotas metacíclicas para outro hospedeiro (Kamhawi, 2006).

Dentro do sistema digestivo do inseto, as formas amastigotas se desenvolvem em promastigotas entre 24 a 48 horas após a ingestão. As promastigotas se reproduzem e migram para o esôfago e faringe (Figura 3). Durante o próximo repasto sanguíneo elas são regurgitadas e penetram na derme do hospedeiro vertebrado (Kamhawi, 2006). Quando o hospedeiro vertebrado é infectado pelas promastigotas, estas são fagocitadas por macrófagos e se transformam em amastigotas (Figura 4).

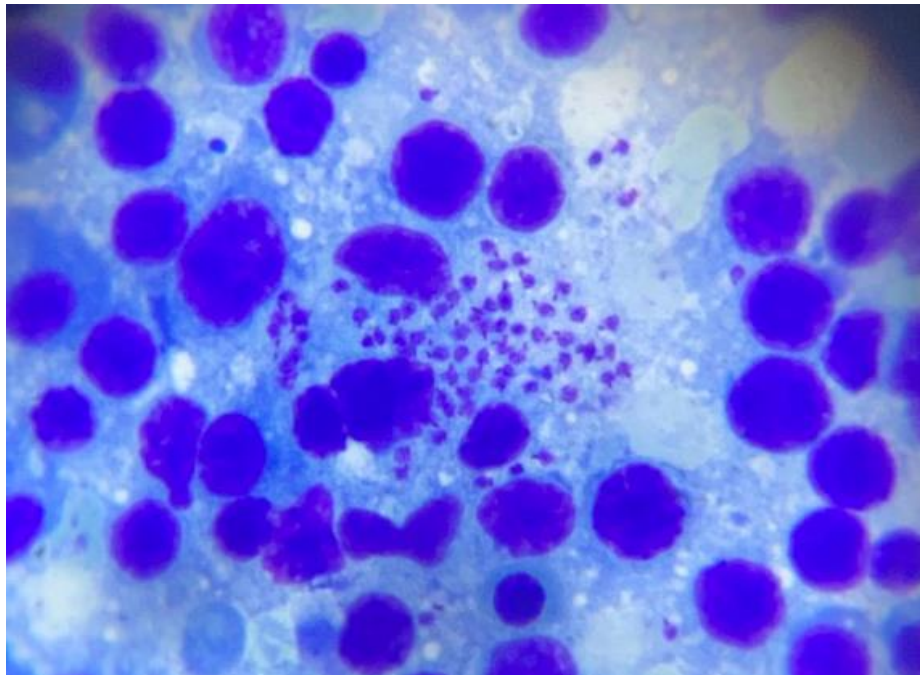
Dentro dos macrófagos, as amastigotas se desenvolvem e se reproduzem, onde conseguem romper os macrófagos, sendo liberadas no meio extracelular e são, então, novamente fagocitadas por outros macrófagos (Handman; Bullen, 2002; Neves, 2016). A transmissão da doença para os hospedeiros vertebrados geralmente ocorre por transmissão vetorial (Marcondes; Rossi, 2013), porém na ausência do vetor já foi relatada a transmissão sexual e vertical em humanos (Dahal et al., 2021; Turchetti et al., 2014).

Figura 3. Formas promastigotas do protozoário *Leishmania (L.) infantum* provenientes de meio de cultivo, coradas com Giemsa, objetiva de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

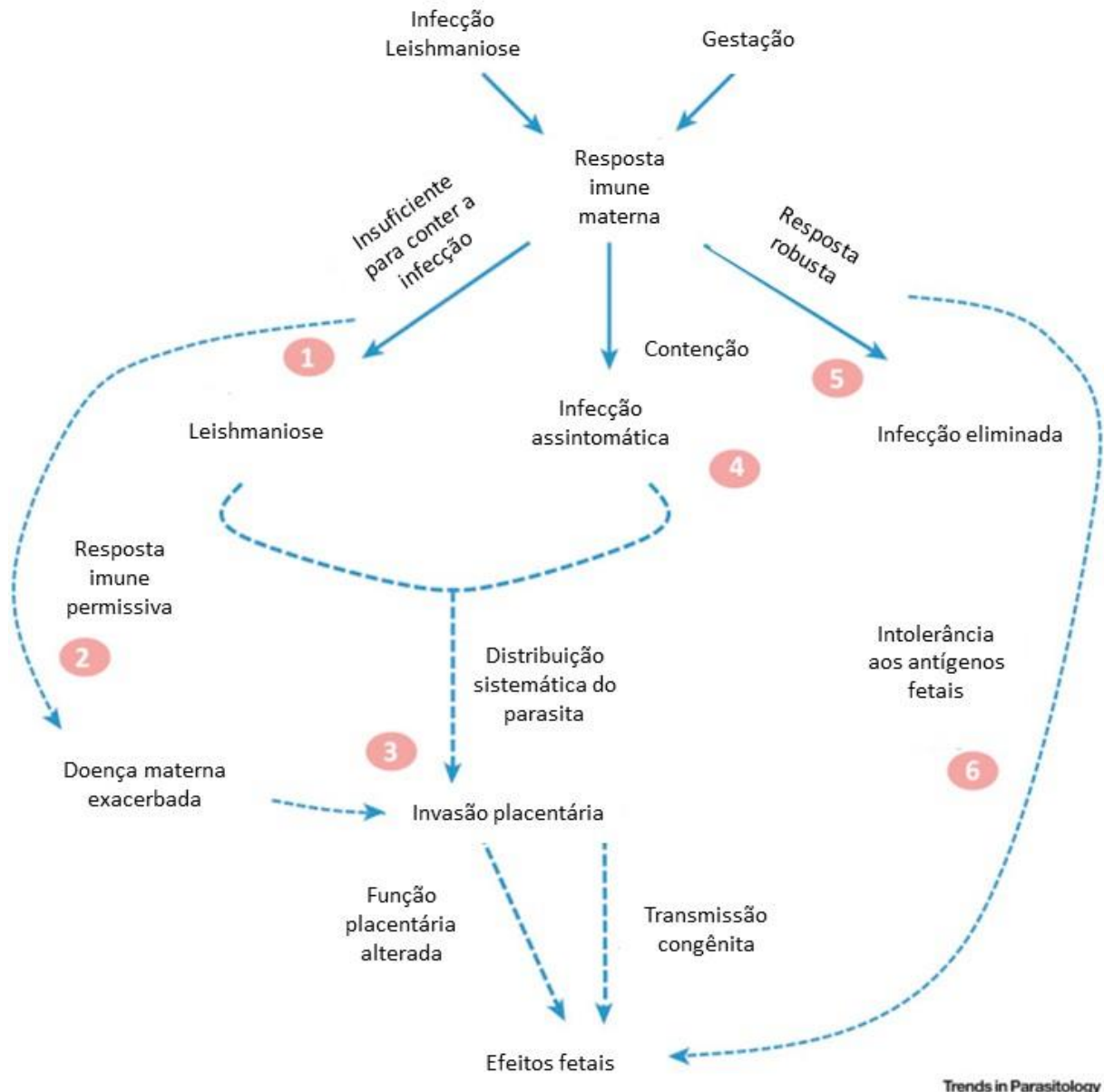
Figura 4. Formas amastigotas do protozoário *Leishmania (L.) infantum* infectando células do sistema fagocítico monocuclear de um cão, coradas com giemsa, objetiva de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

A transmissão placentária de LV em humanos é um fenômeno pouco comum, porém documentada em casos pontuais. Embora a principal via de transmissão seja por meio da picada de flebotomíneos infectados, há evidências de que a infecção também possa ser transmitida durante a gravidez. Esse processo ocorre quando amastigotas de *Leishmania* presentes na corrente sanguínea da mãe atravessam a placenta e infectam o feto em desenvolvimento. A transmissão placentária de LV não é tão comum quanto a transmissão vetorial, mas a sua ocorrência é uma preocupação em áreas endêmicas. Os mecanismos exatos pelos quais a infecção é transmitida da mãe para o feto ainda não são totalmente compreendidos, mas acredita-se que estejam relacionados com a presença de parasitos na circulação sanguínea materna (Figura 5). A transmissão placentária destaca a importância da vigilância obstétrica em regiões endêmicas e a necessidade de mais pesquisas para compreender melhor essa via de transmissão e desenvolver estratégias de prevenção adequadas (Berger et al., 2017).

Figura 5. Esquema representativo da transmissão de LV por via vertical (placentária).



Fonte: Adaptado de Berger et al., 2017.

A maioria dos cães infectados com LV não desenvolvem uma resposta imunológica protetora, resultando em sinais clínicos variados, geralmente de natureza sistêmica, indicando um curso crônico da doença. Estes animais infectados podem apresentar sinais clínicos como lesões cutâneas (pelos sem brilho, alopecia, eczema, descamação, úlceras de pele, nódulos subcutâneos), apatia, perda de peso, emagrecimento, palidez das mucosas, febre irregular, edema, diarreia, coriza, oftalmopatias, onigrogrifose, hepatoesplenomegalia, dentre outros (Lima; Santana, 2022) (Figura 6).

Figura 6. Cães diagnosticados com LV apresentando sintomatologia clínica de blefarite, onicogribose e ulcerações cutâneas típicas.

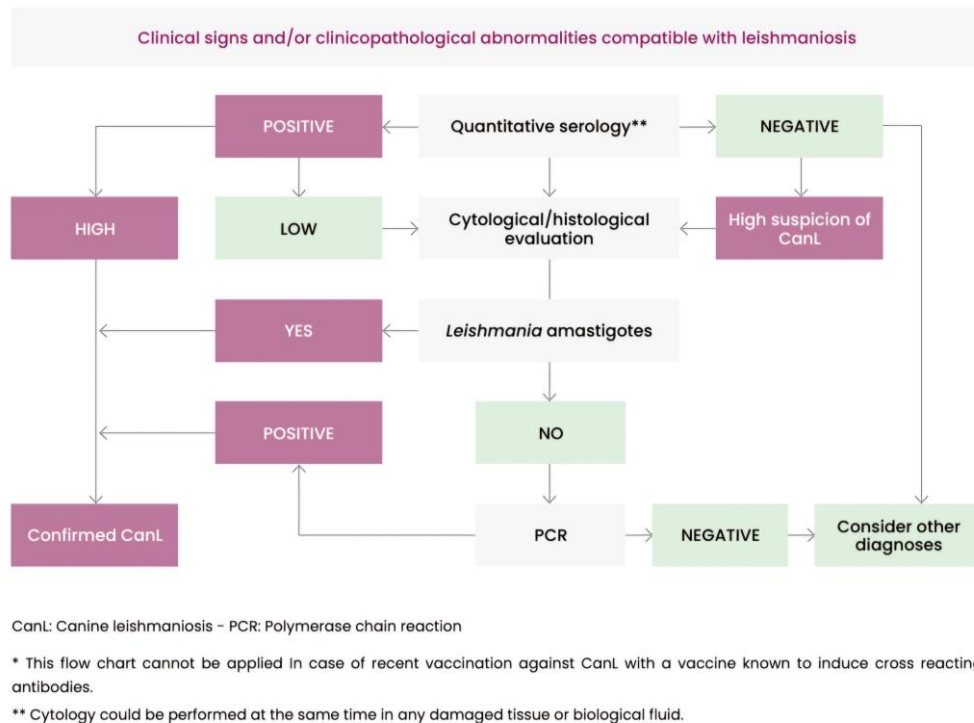


Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Amastigotas de *Leishmania infantum* podem ficar distribuídas em diversos tecidos de cães (Tafari et al., 2004), fazendo com que o animal apresente sinais clínicos atípicos. Dentre estes, podem ser observadas alterações neurológicas (Giannuzzi et al., 2017), nefropatias (Wilson et al., 2017), cardiopatias e pneumopatias (Alves et al., 2010), bem como o envolvimento do sistema genital (Melo Evangelista et al., 2019; 2022). Machos caninos infectados podem desenvolver lesões nos órgãos reprodutivos e apresentar amastigotas de *Leishmania* principalmente no prepúcio, glândula, epidídimo e testículos (Diniz et al., 2005; Silva et al., 2021).

O diagnóstico de LV canina pode ser realizado por meio de exames específicos que detectam a presença do protozoário no sangue, pele, linfonodos e medula do animal (Omitte et al., 2023). Assim, recomenda-se combinar os achados clínico-epidemiológicos com os exames sorológicos, parasitológicos, histopatológicos, imuno-histoquímicos (IMIQ) e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para informar com precisão e precocidade o diagnóstico da doença (Figura 7).

Figura 7. Sinais clínicos e/ou alterações clínico patológicas compatíveis com leishmaniose visceral canina.



Fonte: LeishVet, 2024.

Alterações seminais e estruturais dos órgãos do sistema reprodutivo de cães com LV

O envolvimento das características seminais e do sistema reprodutivo de cães com LV tem sido relatado com pouca frequência. Pesquisas relacionam uma maior quantidade de formas amastigotas de *Leishmania infantum* a uma maior quantidade de lesões inflamatórias no testículo, fato que pode favorecer ao quadro de degeneração testicular (Diniz et al., 2005) e, como consequência, podem alterar a qualidade espermática.

Segundo Labat et al. (2010), em animais com quadro clínico severo da doença é possível observar diminuição do volume do ejaculado e decréscimo da concentração espermática, durante oito coletas semanais. Estes autores afirmam que houve redução contínua da motilidade retilínea e progressiva nas últimas semanas de coleta. Além disso, em estágios mais avançados da doença, foi possível observar mais alterações espermáticas com a porcentagem de defeitos totais de aproximadamente 96%. As patologias espermáticas mais frequentemente encontradas nos cães com LV deste trabalho foram cauda fortemente dobrada (defeito maior) e cauda enrolada (defeito menor), corroborando com as alterações observadas no trabalho de Melo Evangelista et al. (2020).

Labat et al. (2010) também observaram a presença de hiperproteinemia nos animais soropositivos, tanto em estágio moderado como mais avançado da doença, principalmente quando comparados com o grupo-controle, resultados similares aos de Campino et al. (2000), em que os animais apresentaram diminuição do número de leucócitos, plaquetas e a quantidade de proteínas séricas totais foi elevada, com inversão em relação à albumina-globulina quando comparada com os resultados do grupo-controle.

Correia (2015) revelou que animais diagnosticados com LV apresentam hiperviscosidade sanguínea geralmente associada com a hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia. Podendo também ocorrer proteinúria, que seria consequência de alterações e lesões a nível glomerular e tubular.

Cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* normalmente não apresentam alterações macroscópicas nos testículos, porém na histologia possuem lesões e algumas vezes são caracterizadas por processos inflamatórios intersticiais agudos e subagudos com atrofia degenerativa do epitélio seminífero (Diniz et al. 2005; Melo Evangelista et al., 2019).

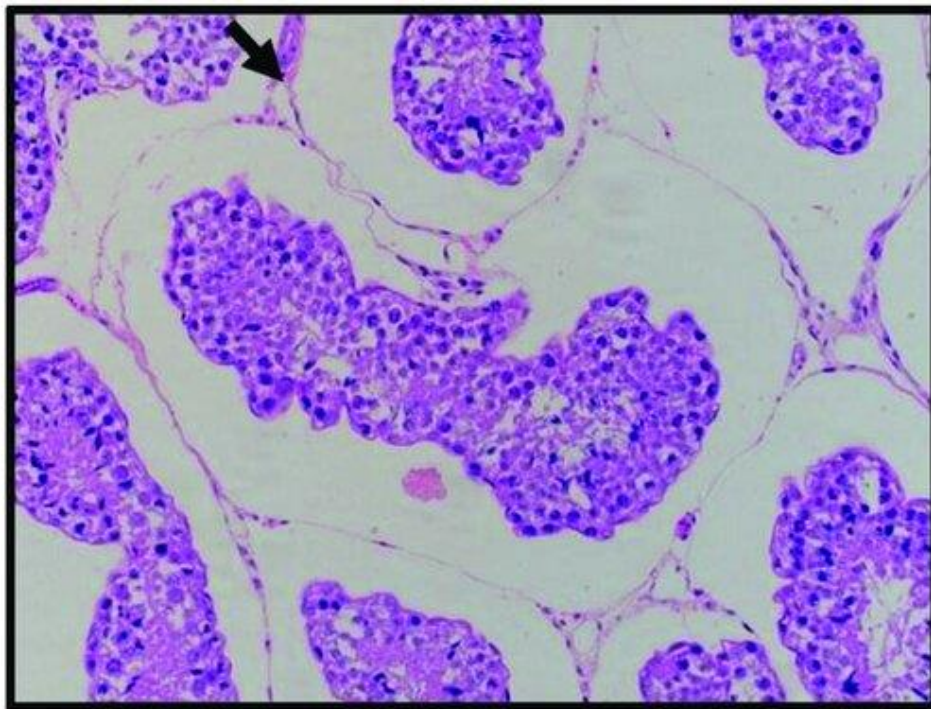
Boechat et al. (2020) e Manna et al. (2012) descreveram lesões testiculares e epididimárias em cães naturalmente infectados com LV e distribuídos em grupos conforme a intensidade da doença. Esses autores verificaram reação inflamatória intersticial composta por macrófagos, plasmócitos e linfócitos associada à presença de amastigotas intralésionais, sendo que as lesões mais graves foram observadas nos animais com doença clínica mais avançada. Também foram observados infiltrado inflamatório com alterações degenerativas nas células tubulares testiculares e epididimárias e fibrose intersticial.

Há relatos na literatura afirmando sobre a presença de amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* na glândula do pênis de um cão com tumor venéreo transmissível (TVT), com reação inflamatória e predomínio de macrófagos infectados (Marino et al., 2012; Trevizan et al., 2012), sendo importante investigar o protozoário na ocorrência de nódulos nestes animais, principalmente nos que vivem em áreas endêmicas.

Diniz et al. (2005) observaram reação inflamatória histioplasmocitária. Esse tipo de lesão estava associado com uma dermatite granulomatosa, erosão e ulceração, somado com a presença de macrófagos parasitados no prepúcio. Os cães apresentaram epididimite, balanopostite e, em menor frequência, orquite. No trabalho de Melo Evangelista et al. (2019), os autores verificaram que os animais infectados tiveram maior tendência a apresentar orquite em relação aos animais controle e, além disso, os cães sintomáticos apresentaram inflamação testicular mais intensa (Figura 8).

Quanto maior a frequência e a intensidade das reações inflamatórias nos órgãos, mais perceptíveis serão as manifestações clínicas de LV apresentadas pelos animais, assim como a carga parasitária encontrada nos órgãos. A quantidade de amastigotas de *Leishmania infantum* presentes nos testículos atuam como fator preponderante da resposta inflamatória e a degeneração testicular possivelmente é uma consequência deste processo inflamatório (Diniz et al., 2005).

Figura 8. Histopatologia de testículo de um cão diagnosticado com LV, mostrando degeneração e atrofia do epitélio seminífero.



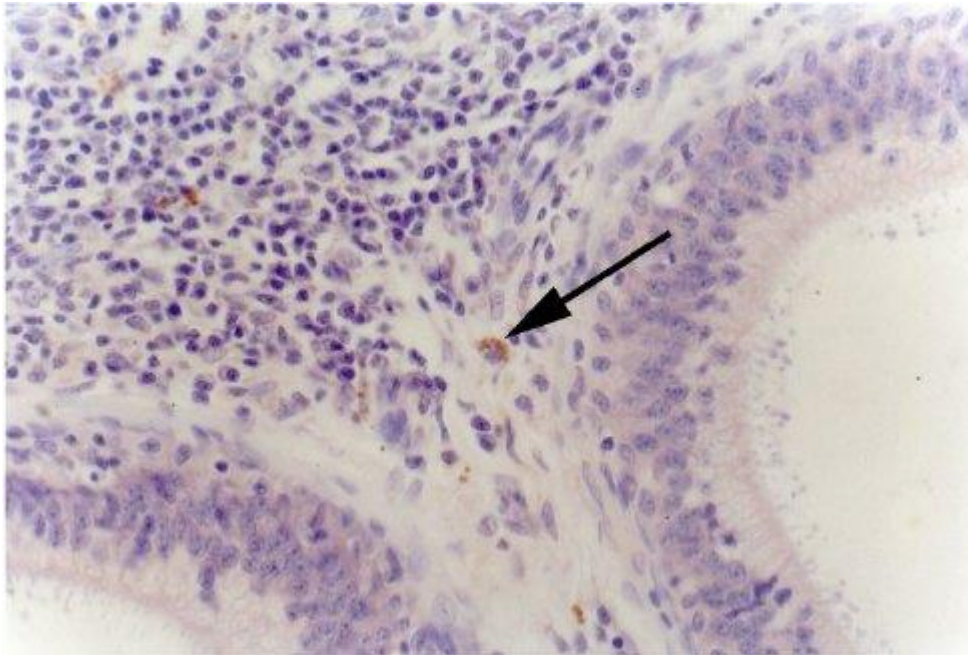
Fonte: Melo Evangelista et al., 2019.

A imunomarcagem de amastigotas de *Leishmania infantum* nos macrófagos testiculares de cães sorologicamente positivos foi ratificada com a presença de um infiltrado inflamatório linfocitário, caracterizando uma resposta imune local (Diniz et al., 2005). Também tem sido encontrado infiltrado inflamatório linfocitário no epidídimo de cães, além de fibrose com adelgaçamento do epitélio e azoospermia, ressaltando maior quantidade de amastigotas de *Leishmania* em testículos e epidídimos (Carvalho Júnior et al., 2017).

Amastigotas desse protozoário no epidídimo de cães (Figura 9) altera o perfil leucocitário, ocorrendo maior migração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos para o lúmen

do órgão, indicando uma resposta imune mais retardatória, corroborando com casos crônicos e elevada parasitemia (Benites et al., 2011).

Figura 9. Imunohistoquímica de epidídimo de um cão diagnosticado com LV, mostrando infiltrado linfoplasmocitário e células infectadas por amastigotas de *Leishmania infantum* (coradas em marrom, seta).



Fonte: Turchetti et al., 2014.

A transmissão sexual de LV tem sido relatada em cães machos sexualmente maduros, com a detecção do protozoário no esmegma e sêmen, avaliados por meio da técnica de PCR (Silva et al., 2009; Silva et al., 2014).

Mesmo com poucos relatos na literatura, dados confirmam a existência de lesões genitais e a presença de *Leishmania* nestes órgãos em cães com LV, frisando o potencial para transmissão sexual da doença nessa espécie animal. Portanto, é importante investigar melhor a presença do parasito e a carga parasitária nos órgãos reprodutivos de cães e cadelas naturalmente infectados, principalmente daqueles que vivem em áreas endêmicas para LV.

3. METODOLOGIA

Essa pesquisa foi realizada de dezembro de 2022 a agosto de 2023, onde foram selecionados 34 cães aleatoriamente, provenientes de atendimentos realizados na Unidade de Vigilância em Zoonoses (UVZ) do município de Timon-Maranhão, Brasil. A pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI) sob o número de protocolo 755/2022. As técnicas de diagnóstico e as castrações dos animais deste trabalho foram realizadas no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco da Universidade Federal do Piauí (NUPCelt/UFPI).

3.1 Exame clínico dos animais

Como critério de inclusão foram selecionados cães acima de seis meses de idade, independente da raça e do sexo, atendidos na UVZ de Timon e como critérios de exclusão, foram retirados desta pesquisa cães com secreções, tumores, miíases e quaisquer lesões expostas e visíveis nos órgãos genitais.

Todos os animais passaram por anamnese e exame clínico. Eles foram avaliados de acordo com o estado geral, estado nutricional (escore corporal), pelagem, se tinha ou não a presença de ectoparasitos, presença ou ausência de lesões na face (orelhas, focinho e lábios), se havia áreas de alopecia e lesões de pele (dermatites), e presença ou ausência de alterações oftálmicas (blefarite, conjuntivite e/ou ceratoconjuntivite, uveíte). Esses parâmetros foram avaliados em uma escala de 0 (zero) a 5 (cinco), onde 0 - indicou ausência e 5 - presença em grande quantidade. Também foram observadas as mucosas oral e ocular, e avaliação do tamanho dos linfonodos, principalmente os submandibulares e poplíteos (se normais ou aumentados de tamanho - reativos). Foram coletados materiais por meio de swab do prepúcio dos machos e da vulva/vagina das fêmeas.

3.2 Coleta das amostras

Para a coleta do material biológico, realizada na UVZ de Timon-MA, os cães foram contidos com auxílio de focinheira e em seguida foram submetidos a tricotomia e assepsia com álcool 70% na região torácica, para assegurar a realização do aspirado de medula óssea através da punção na crista do esterno. Foram utilizadas seringas de 20 mL e agulha 18 G para a punção medular. Foi realizado também o aspirado de linfonodos poplíteos reativos, utilizando seringa de 10 mL e agulha 21 G, e, ainda, coleta de sangue da veia cefálica para a realização dos testes sorológicos e parasitológicos. Esse material foi avaliado por meio de esfregaço direto para a pesquisa de amastigotas de *Leishmania infantum* e para a cultura em meio NNN enriquecido com meio Shneider's, com a finalidade de desenvolvimento de

promastigotas e, adicionalmente, foram encaminhados para a realização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) convencional e quantitativo.

Após as avaliações e diagnósticos prévios de LV, os tutores foram orientados a levarem seus animais para o NUPCelt/UFPI para a realização da orquiectomia (machos) ou ovariectomia (fêmeas). Nos machos, foram retirados os complexos testículos-epidídimos (CTEs) e nas fêmeas, fragmentos do útero e ovário também foram retirados e levados para avaliação.

Os testes sorológicos (TRDPP® e ensaio imunoenzimático - ELISA) e parasitológicos dos cães objeto deste estudo, assim como a pesquisa e a identificação do DNA de *Leishmania (L.) infantum* por PCR no esmegma prepucial, na citologia vaginal e nos órgãos do sistema reprodutivo destes animais foram realizados no NUPCelt/UFPI.

3.3 Processamento das amostras

As lâminas de esfregaço direto do aspirado de medula óssea e dos linfonos reativos foram fixadas em metanol e coradas com giemsa para a pesquisa de amastigotas de *Leishmania infantum* e a leitura foi realizada sob microscópio óptico, na objetiva de 100x.

Os meios de cultura foram colocados na B.O.D. e avaliados em cinco leituras, no 3º, 5º, 7º, 9º e 12º dias após a coleta e semeadura do material. Das culturas foram retirados 20µL, colocados em lâminas com lamínulas, levados ao microscópio óptico e observados na objetiva de 40x para a pesquisa de formas promastigotas de *Leishmania infantum*.

Para extração do DNA foi utilizado o kit da Ludwing 1820-02, seguindo as recomendações do fabricante para cada tipo de amostra. A quantidade de DNA foi determinada utilizando espectrofotômetro Nanodrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific). Após a extração, o DNA foi identificado com as etiquetas específicas e mantido à temperatura de -20 °C em caixa devidamente identificada.

Antes de iniciar a reação, foi realizada a limpeza da cabine de PCR, das micropipetas e das caixas de ponteiras com álcool 70% e deixados em luz UV por 20 a 30 minutos. Em seguida, foi realizada a preparação dos reagentes para o PCR convencional e em tempo real (qPCR), com as preparações das diluições da curva padrão fazendo uma diluição seriada de cultura de *Leishmania* contendo: 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 parasitos/uL. Após a preparação da curva padrão, foi realizada a preparação do mix (master mix + ensaio (sonda e primers) do qPCR. Em cada placa de amplificação foram utilizados controles positivos DNA de *L. infantum* e negativos (Água ultra pura) e o limiar basal de fluorescência para determinação do ciclo de quantificação (Cq) ou *threshold* fixado em 0,1.

3.4 Realização das castrações

Fêmeas e machos caninos foram submetidos as medicações pré-anestésicas com protocolo de acepromazina (0,02 mg/kg), midazolam (0,3 mg/kg), tramadol (4,0 mg/kg), cetamina (10,0 mg/kg) IM, seguido de bloqueio local com lidocaína SC (4,0 mg/kg) na linha de incisão pré escotal e indução com propofol (5mg/kg) IV, aplicado gradualmente de acordo com a resposta individual de cada animal. A manutenção com anestesia de acordo com a dose-resposta foi realizada com isoflurano .

Após quinze minutos da aplicação dos fármacos, os animais foram encaminhados para a sala pré-cirúrgica para o estabelecimento do acesso venoso, tricotomia na região cirúrgica e, posteriormente, direcionados para a sala cirúrgica. As mensurações de frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), temperatura corporal (T°C), tempo de reperfusão capilar (TRC) foram realizadas antes da aplicação dos fármacos anestésicos (M0) e imediatamente após o procedimento anestésico (M1). M0: o paciente ainda respondia ao estímulo de dor superficial por apreensão da prega interdigital com pinça de dissecação anatômica e M1: o animal já estava em plano anestésico.

A ovariectomia (OH) foi realizada nas cadelas com a incisão pela linha média ventral e após a exposição do útero foram realizadas as ligaduras nos pedículos ovarianos com fio nylon 2.0 e da cérvix uterina, síntese pós ligadura, retirando assim todo o órgão reprodutivo da fêmea (Fossum et al., 2021).

A orquiectomia dos cães foi realizada pelo acesso pré-escrotal, expondo o testículo direito e esquerdo, síntese na túnica dartos e na fáscia espermática, expondo o testículo envolvido pela túnica vaginal parietal. Localizado então o cordão espermático, este foi ligado com fio inabsorvível nylon 2.0 e exérese do órgão reprodutor do macho (Fossum et al., 2021).

Os órgãos genitais dos cães foram armazenados em meio RPMI e acondicionados em freezer -20°C para posterior análise por PCR convencional e quantitativo (qPCR) no Laboratório de Biologia Molecular do NUPCelt/UFPI.

3.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados de forma quantitativa, comparando as técnicas de diagnóstico parasitológico do aspirado de medula, PCR e qPCR tanto de medula como dos órgãos genitais dos cães empregando o teste de McNemar's.

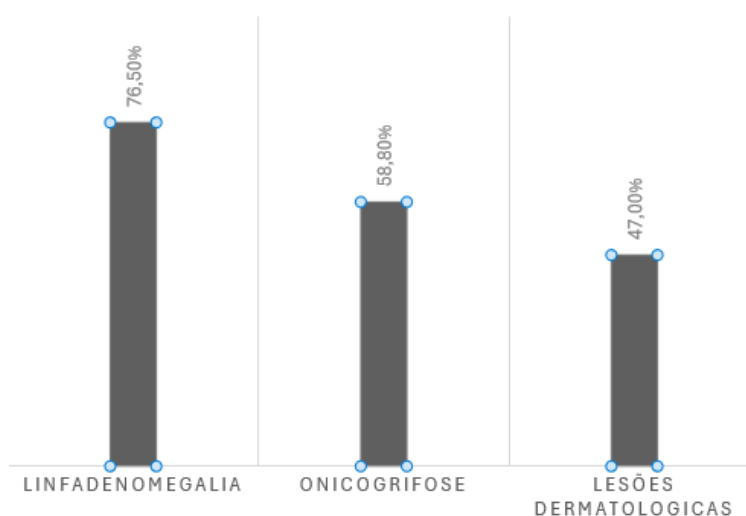
4. RESULTADOS

Foram avaliados 34 animais durante o período da pesquisa, sendo 15 fêmeas e 19 machos. Vinte e quatro cães (70,6%) eram sem raça definida (SRD), dois eram da raça American Pit Bull Terrier, dois Pinscher e, ainda, um representante de cada uma dessas raças: Poodle, Rottweiler, Yorkshire, Shih Tzu, Pastor Alemão e Weimaraner.

Dos animais avaliados, 16 (47,0%) foram positivos para LV no teste sorológico de ELISA, demonstrando uma alta soroprevalência da doença em cães domiciliados no município de Timon, Maranhão. No exame parasitológico do aspirado de medula, 15 animais (44,1%) foram positivos para *Leishmania infantum*, destes 11 (32,3%) foram positivos na cultura e 10 (29,4%) no exame molecular qPCR de medula óssea, confirmando a presença de *Leishmania infantum* nestes animais.

Todos os animais positivos no ELISA e no parasitológico apresentaram pelo menos um sinal clínico sugestivo da doença. A principal manifestação clínica apresentada por estes animais foi a linfadenomegalia (76,5%), seguida de onicogrifose (58,8%) e alguma lesão dermatológica e/ou alopecia, incluindo lesões na face (feridas no focinho e/ou ponta de orelhas) (47,0%). Alterações oftálmicas também foram observadas, principalmente blefarite e conjuntivite. Vale destacar a presença de ectoparasitos na metade dos animais deste estudo, especialmente carrapatos.

Figura 20. Gráfico dos principais sinais clínicos observados nos animais positivos para leishmaniose visceral.



Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Figura 11. Prancha com as principais manifestações clínicas observadas nos animais. A e B: onicogribose; C: ectoparasitos; D, E e F: lesões dermatológicas; G: ferida em ponta de orelha; H: lesão dermatológica ulcerada na pata; I: blefarite/uveíte.

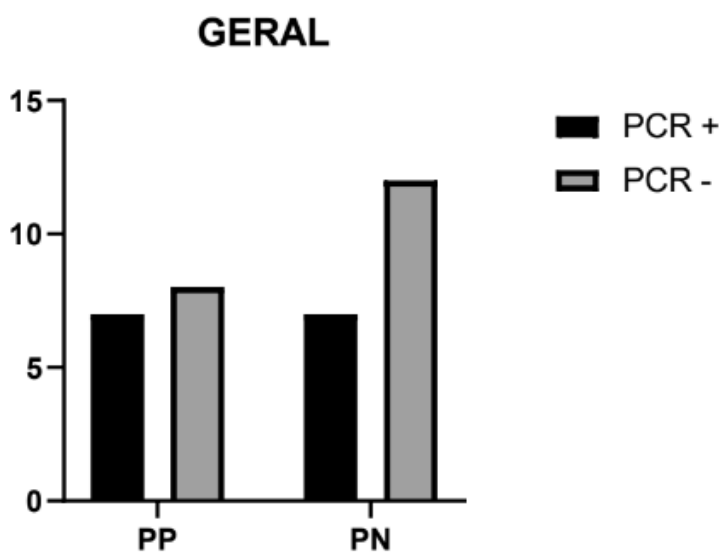


Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Com relação ao encontro do parasito nos órgãos do sistema reprodutivo, 14 animais (41,2%) confirmaram a presença do DNA do protozoário por meio do qPCR, sendo 09 machos e 05 fêmeas.

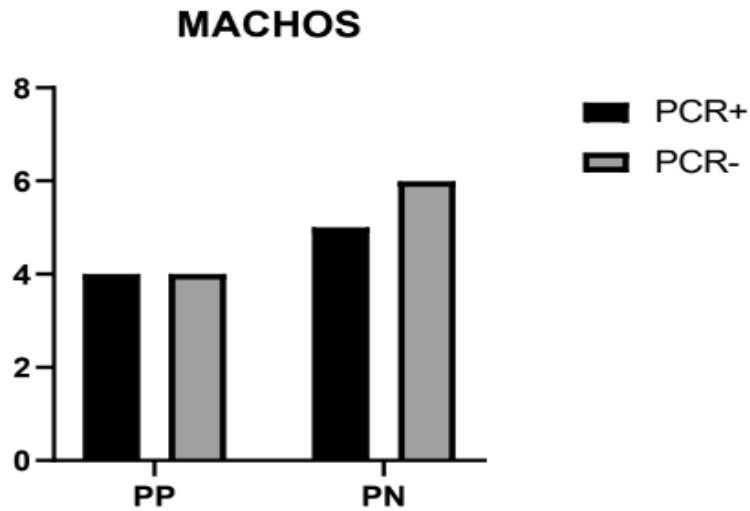
De acordo com o teste de McNemar's empregado, cães positivos para LV no exame parasitológico de esfregaço direto de medula tiveram uma razão de chance (OR) de 87,5% de também apresentarem positividade no qPCR de medula. Fêmeas caninas positivas para *Leishmania infantum* no parasitológico de medula demonstraram uma OR de 50% também positivarem no qPCR de útero e no caso de cães machos positivos no parasitológico de medula, a OR foi maior que 1, ou seja, a positividade destes animais para *Leishmania infantum* no qPCR dos CTEs foi maior do que a probabilidade esperada. As figuras abaixo mostram estes resultados.

Figura 12. Total de cães positivos e negativos para LV no parasitológico e qPCR de aspirado de medula dos 34 animais avaliados, de acordo com o teste de McNemar's empregado.



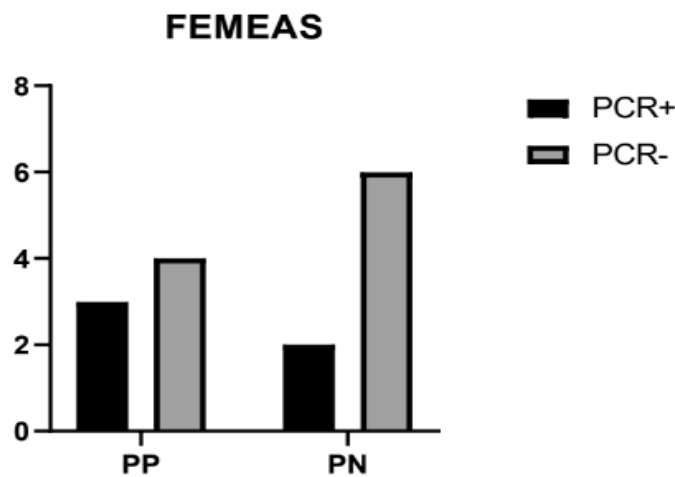
Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Figura 13. Total de cães positivos e negativos para LV no parasitológico de aspirado de medula e qPCR dos CTEs dos 19 machos avaliados, de acordo com o teste de McNemar's empregado.



Fonte: Elaborado pela autora,2023

Figura 14. Total de cadelas positivas e negativas para LV no parasitológico de aspirado de medula e qPCR dos úteros das 15 fêmeas avaliadas, de acordo com o teste de McNemar's empregado.



Fonte: Elaborado pela autora,2023

Nesta pesquisa, foi possível observar positividade para *Leishmania infantum* também por meio da técnica qPCR no material coletado do swab vaginal de duas cadelas e do swab

prevalência de dois cães, sendo que uma fêmea e um macho também apresentaram positividade em seus órgãos genitais, e estes animais foram positivos em todas as técnicas de diagnóstico realizadas neste estudo. Sendo assim, eles podem servir como fonte de infecção para outros hospedeiros, principalmente outros cães, tanto pela transmissão vetorial como por via sexual por contato direto com a mucosa genital.

5. DISCUSSÃO

A cidade de Timon-MA faz fronteira com Teresina, capital do Piauí, estando separadas pelo rio Parnaíba e ambos os municípios são considerados áreas endêmicas para a LV canina (Batista et al., 2021; Lima et al., 2024; Rebêlo et al., 1999). Em Timon, foi possível observar uma prevalência de quase 50% nos cães avaliados nesta pesquisa, confirmando a presença de *Leishmania infantum* por meio de esfregaço direto e PCR de medula óssea.

Vale ressaltar que os animais eram sintomáticos, apresentando pelo menos um sinal clínico sugestivo da enfermidade, razão pelo qual os tutores procuraram atendimento veterinário. Esse resultado comprova a ocorrência da infecção em cães domiciliados no município em questão e a manutenção do ciclo do parasito naquela área, revelando, ainda, que estes achados refletem apenas os dados de animais que foram atendidos pela UVZ de Timon durante o primeiro semestre do ano de 2023, servindo de alerta e vigilância para a doença naquela localidade e população.

O estado do Maranhão liderou o número de casos de LV em humanos no Brasil nos últimos anos, com a capital São Luís e os municípios de Caxias e Imperatriz apresentando o maior número de casos (Milhomem, 2023; Sousa, 2022; Soares et al., 2023). A cidade de Timon carece de dados publicados da doença tanto em humanos quanto em caninos.

Estudos sobre LV em cães normalmente estão relacionados aos inquéritos soroepidemiológicos dos centros de controle de zoonoses de algumas cidades do país (Menegatti et al., 2020; Melo et al., 2021; Soares et al., 2023). Esses desencontros de dados entre LV humana e LV canina se deve ao fato de não haver um sistema de notificação para essa doença em cães, como ocorre em humanos, bem como a realização de testes sorológicos como forma de confirmação da doença em caninos, prejudicando a consistência de dados de LV nessa espécie animal. Até a realização dessa pesquisa, o município de Timon apresentava apenas prevalência de LV em humanos (Sousa, 2022) e nenhum resultado registrado de prevalência de LV canina.

Com relação à raça, a maioria (70,6%) dos cães infectados eram SRD. Esse resultado também é o mais frequentemente relatado na literatura (Gonçalves, 2014; Menegatti

et al., 2020; Melo et al., 2021). Possivelmente por se tratar de uma raça mais associada aos tutores com menor poder aquisitivo, que residem em áreas com infraestrutura sanitária e saneamento básico precários, locais mais propícios ao desenvolvimento do inseto vetor (Melo et al., 2021). Ressalta-se, ainda, que todos os animais foram atendidos na UVZ de Timon, uma instituição pública que presta serviço veterinário gratuito à população local.

Quanto aos sinais clínicos manifestados pelos animais, foi possível observar que a linfadenomegalia foi o sinal mais frequente, corroborando com uma pesquisa realizada em Parnaíba-PI (Melo et al., 2021), que avaliou a prevalência de LV em cães durante o período de 2015 a 2018. Outros autores de um trabalho realizado no Maranhão também consideraram esse sinal clínico um dos mais relatados em cães (Milhomem, 2023), bem como em outra pesquisa realizada no Sudeste do Brasil (Costa et al., 2024).

Vale frisar que a metade dos animais deste estudo possuíam ectoparasitos no momento da avaliação física, especialmente carrapatos, no entanto outras enfermidades transmitidas por estes vetores não foram exploradas. Pesquisas tem relacionado alguns fatores associados à alta soroprevalência de LV canina em áreas endêmicas do Nordeste com altas infestações de carrapatos (Bernardino et al., 2020), mostrando a necessidade de investigar melhor o papel destes artrópodes na epidemiologia dessa enfermidade.

Dos 15 (44,1%) animais positivos para LV no exame parasitológico do esfregaço de aspirado de medula óssea, 11 (32,3%) também foram positivos na cultura e 10 (29,4%) no qPCR de medula. O método parasitológico é uma ferramenta bastante confiável para diagnosticar LV, apresentando 100% de especificidade. Porém sua sensibilidade varia conforme o grau de parasitismo, o tipo de material biológico coletado, seu processamento, a coloração e a habilidade do observador, que realiza a observação direta das formas amastigotas do parasito em esfregaços de linfonodos, medula óssea, lesões de pele, aspirado esplênico, biópsia hepática e até esfregaços sanguíneos (Laurenti, 2009). A técnica de PCR vem demonstrando uma boa concordância com os métodos parasitológicos empregados (Silva, 2009).

Neste trabalho, além da observação de formas amastigotas do parasito no esfregaço do aspirado de medula, também foram visualizadas as formas promastigotas por meio de cultura. Essa técnica vem sendo bastante empregada para os casos de LV em cães com resultados satisfatórios (Silva, 2009), contudo pode haver contaminação do material ao longo das leituras. Nas amostras dos cães dessa pesquisa, quatro sofreram contaminação por fungos, o que impediu a conclusão do diagnóstico por esta técnica.

Nos órgãos reprodutivos dos animais estudados, confirmou-se a presença do DNA do protozoário por meio da técnica de qPCR em 14 (41,2%) animais, sendo 09 machos e 05 fêmeas, ratificando um maior tropismo de *Leishmania infantum* para os órgãos genitais masculinos (Diniz et al., 2005; Oliveira et al., 2016b; Silva et al., 2008). Nos últimos anos, houve um aumento significativo de estudos com relação ao modo de transmissão de *Leishmania infantum* por via sexual em cães, revelando descobertas da presença de amastigotas do protozoário nos órgãos reprodutivos tanto de machos quanto de fêmeas (Boechat et al., 2016; 2021). Pesquisas também confirmaram amastigotas de *Leishmania* nas secreções vaginais de cadelas infectadas, principalmente não castradas (Magro et al., 2017).

A presença de DNA de *L. infantum* em testículos de cães ou útero de cadelas pode demonstrar a importância da transmissão sexual e vertical de LV nessa espécie animal. Nas fêmeas, a infecção uterina, mesmo sem lesões aparentes, pode sugerir que a transmissão vertical seja uma via que mereça mais atenção dos pesquisadores, especialmente em animais de áreas endêmicas, como é o caso de Timon.

6. CONCLUSÃO

Concluiu-se que é importante a associação de técnicas de diagnóstico parasitológico e molecular para a confirmação de LV em cães domiciliados em áreas endêmicas, a exemplo do município de Timon, destacando, ainda, que a técnica de qPCR é uma excelente ferramenta para detectar a presença do DNA do parasito na mucosa da vagina, do prepúcio, no CTE e útero de caninos com LV, ajudando a elucidar o ciclo epidemiológico da doença, servindo de alerta e vigilância para a possibilidade de transmissão sexual e vertical nessa espécie animal.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A leishmaniose visceral é uma zoonose de suma importância para saúde pública. Com o avanço dos estudos, várias descobertas estão sendo descritas, principalmente com relação as técnicas de diagnóstico para avaliar a presença do parasito em diferentes órgãos dos animais. Com este estudo, foi possível obter resultados sobre o qPCR, que é um relevante método de diagnóstico molecular para detectar o DNA do parasito em vários tecidos, como em órgãos genitais de cães e cadelas com LV. Novas pesquisas devem ser realizadas na região Nordeste, principalmente no estado do Maranhão e circunvizinhos, que atualmente são considerados os locais com maior número de casos de LV em humanos no país, onde possivelmente o cão é o principal reservatório animal nessa região.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G.B.B. et al. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 310-315, 2010.
- BATES, P.A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 340-344, 2008.
- BATISTA, F.M.A. et al. Perfil epidemiológico e tendência temporal da leishmaniose visceral: Piauí, Brasil, 2008 a 2018. **Caderno de Saúde Pública**, v. 37, n. 11, p. 1-12, 2021.
- BENITES, A.P. et al. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 72-77, 2011.
- BERGER, B.A. et al. Pathophysiology of *Leishmania* Infection during Pregnancy. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 12, p. 935-946, 2017.
- BERNADINHO, M.G.S. et al. High seroprevalence and associated factors for visceral leishmaniasis in dogs in a transmission area of Paraíba state, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 2, p. 1-9, 2020.
- BOECHAT, V.C. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 115, p. 2371-2379, 2016.
- BOECHAT, V.C. et al. Frequency, active infection and load of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract of male and female dogs. **PloS One**, v. 15, n. 9, p. 1-18, 2021.
- BORGES, D.A. et al. First record of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on the Trinational Frontier (Brazil-Peru-Bolivia) of South-Western Amazonia. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 5, p. 1425-1429, 2017.
- BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária do Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia de Bolso Leishmaniose Visceral**. Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinária. 1ª ed., Brasília - DF: CFMV, 2020. 194p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância**, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais. Brasília: Ministério da Saúde; 2016.
- Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia da UFMG. **Atlas de Parasitologia Veterinária**. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, n. 92, 2019. 76p.

CAMPINO, L. et al. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 45, p. 269-275, 2000.

CARVALHO JUNIOR, C. G. et al. Parasitism and inflammation in ear skin and in genital tissues of symptomatic and asymptomatic male dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 116, n. 3, p. 987–995, 2017.

CORREIA, A.V.G.M. **Perfil clínico-epidemiológico da Leishmaniose visceral em Teresina-PI**. 2015. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, FIOCRUZ, Teresina, 2015. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13944>. Acesso em: 4 fev. 2024.

COSTA, R.F. et al. Principais manifestações clínicas encontradas em cães positivos para Leishmaniose com titulação acima de 1:80. **Revista Bionorte**, v. 13, n. 1, p. 503-510, 2024.

CRUZ, I. et al. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **Lancet**, v. 359, p. 1124-1125, 2002.

DAHAL, P. et al. Visceral Leishmaniasis in pregnancy and vertical transmission: A systematic literature review on the therapeutic orphans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1-27, 2021.

DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 165-170, 2006.

DINIZ, S.A. et al. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 650-658, 2005.

FEITOSA, M. M. Leishmaniose visceral: um desafio crescente. São Paulo: **Intervet pet**, 2001. 15p.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 5ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2021.

FRANÇA, A.O. et al. *Leishmania* infection in blood donors: a new challenge in leishmaniasis transmission? **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1-13, 2018.

GIANNUZZI, A.P. et al. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, p. 125-138, 2017.

HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332-334, 2002.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

- LABAT, E. et al. Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 609-614, 2010.
- LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13-23, 2009.
- LEISHVET. A Brief for the Practicing Veterinarian. ALIVE 2 Special Edition. **Canine Leishmaniosis**. 2024. 11p.
- LIMA, F.A.; SANTANA, L.S. **Casuística de cães com suspeita de leishmaniose visceral canina atendidos no hospital veterinário da UFRA, no período de 2016 A 2021**. 2022. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural da Amazônia UFRA, Belém, 2022. Disponível em:
<http://bdta.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/2349>. Acesso em: 4 fev. 2024.
- LIMA, T.A. et al. Perfil Epidemiológico da Leishmaniose Visceral em Teresina, Piauí, de 2013 a 2020. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 2, p. 768-782, 2024.
- LOW, G.C.; COOKE, W.E. A congenital case of Kala-azar. **Lancet**, v. 208, n. 5389, p. 1209-1211, 1926.
- MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da Leishmaniose Visceral Canina. **Clínica Veterinária**, Ano XII, n. 71, p. 50-58, 2007.
- MAGRO A.G. et al. *Leishmania infantum* is present in vaginal secretions of naturally infected bitches at lower levels in oestrogenized bitches than in non-oestrogenized bitches. **Acta Parasitologica**, v. 62, n. 3, p. 625-629, 2017.
- MANNA, L. et al. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 216, p. 1-4, 2012.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.
- MARGONARI, C. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 31-38, 2006.
- MARINO, G.; GAGLIO, G.; ZANGHÌ, A. Clinicopathological study of canine transmissible venereal tumour in leishmaniotic dogs. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 6, p. 323-327, 2012.

MEINECKE, C.K. et al. Congenital transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v. 104, n. 5, p. 1-5, 1999.

MELO EVANGELISTA, L.S et al. Testicular and seminal evaluation of dogs naturally infected with *Leishmania* sp. **Semina Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 217-224, 2019.

MELO EVANGELISTA, L.S et al. Alterações clínicas, laboratoriais e seminais de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. **Ciência Animal**, v. 30, n. 4, p. 35-47, 2020.

MELO EVANGELISTA, L.S et al. Leishmaniose Visceral: há possibilidade de transmissão sexual e vertical entre cães? **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 16, n. 2, p. 104-112, 2022.

MELO, H.R. et al. Leishmaniose visceral canina no município de Parnaíba, PI. **Revista Brasileira de Educação e Saúde -REBES**, v. 11, n. 3, p. 344-349, 2021.

MENEGATTI, J.A. et al. Fauna flebotomínica e soroprevalência para leishmaniose visceral canina em área urbana na região Centro-Oeste do Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 72, n. 4, p. 1197-1205, 2020.

MILHOMEM, L.S.C. **Epidemiologia da leishmaniose visceral canina no município de Imperatriz, Maranhão, Brasil- Estado da arte. 92f.** Trabalho de conclusão de curso (medicina veterinária). Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, 2023.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 29-45, 2013.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2016. 616p.

NINA, L.N.S. et al. Distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. 1-10, 2023.

NOGUEIRA, R.A. et al. Intense transmission of visceral leishmaniasis in a region of northeastern Brazil: a situation analysis after the discontinuance of a zoonosis control program. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 1, p. 1-9, 2021

OLIVEIRA, V.V.G. et al. Correlation between chronic inflammation, immunostaining and parasite load in the genital system of female dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Ciência Rural**, v.46, n.11, p.2029-2035, 2016a.

OLIVEIRA V.V.G. et al. Histopathological evaluation and parasite quantification (qPCR) in the male dog's genital system after natural infection with *Leishmania infantum*. **Ciência Rural**. V.46, n. 4, p. 641-647, 2016b.

OMITTE, T.H. et al. Leishmaniose Visceral Canina - Revisão Bibliográfica. In: Anais... **9º Fórum Rondoniense de Pesquisa**, v. 9, p. 1-6, 2023.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses Informe Epidemiológico das Américas**, Washington: OPAS, 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>.

QUEIROZ, N.M.G.P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

REBÊLO, J.M.M. et al. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 3, p. 623-630, 1999.

SILVA, D.T. et al. *Leishmania infantum* in the reproductive organs of dogs. **Ciência Rural**, v. 51, n. 10, p. 1-6, 2021.

SILVA, F.L. et al. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 86-90, 2008.

SILVA, F.L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, 2009.

SILVA, L.C. et al. Detection of *Leishmania infantum* in the smegma of infected dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 731-736, 2014.

SILVA, S.R. **Análise comparativa de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares na confirmação do diagnóstico em cães com sorologia positiva para leishmaniose visceral canina**. 93f. Dissertação (Mestre em Ciências) 110f. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte -Minas Gerais, 2009.

SOARES, C.J.A. et al. Mapeamento da leishmaniose canina na cidade de Caxias-Maranhão. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar**, v. 4, n. 10, p. 1-8, 2023.

SOUSA, P. S. Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral em uma macrorregião do Maranhão utilizando dados do sistema de informações de saúde DATASUS. **e-Acadêmica**, v. 3, n. 3, p. 1-8, 2022.

SOUZA, C.P. et al. Serviços de zoonoses e o seu papel na vigilância em saúde para leishmaniose visceral. **Colloquium Vitae**, v. 11, n. 1, p. 24-32, 2019.

SYMMERS, W.S.C. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection: in Britain. **Lancet**, v. 16, p. 127- 132, 1960.

TAFURI, W.L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

TREVIZAN, J.T. et al. Disseminated transmissible venereal tumour associated with Leishmaniasis in a dog. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 356-358, 2012.

TURCHETTI, A.P. et al. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 4, p. 403-407, 2014.

VIOTTO, M.A. **Leishmaniose visceral: etiologia, diagnóstico e tratamento**. 2018. 33f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia). Faculdade de Educação e Meio Ambiente (FAEMA). Ariquemes, 2018. Disponível em:

<https://repositorio.unifaema.edu.br/handle/123456789/2363>. Acesso em: 4 fev. 2024.

WILSON, T.M. et al. Alterações macroscópicas em cães sororreagentes para *Leishmania chagasi* e sua correlação com teste parasitológico. **Veterinária Notícias**, v. 18, n. 2, p. 20-25, 2012.